

THESIS

Munich

1963

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

**Beitrag zur Methodik der
Thrombozytenadhäsionsbestimmung
in Citratblut**

Gerhard Roeber

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Beitrag zur Methodik der
Thrombozytenadhäsionsbestimmung
in Citratblut**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard Roeber
Torgau/Elbe

München 1963

AUS DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF. DR. R. SCHWIEGK

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. R. MARX
Mitberichterstatter: Professor Dr. H. SCHWIEGK
Dekan: Professor Dr. R. BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 12. 63

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer hohen medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard Hofer
Tübingen-Eibe

München 1963

INHALTSÜBERSICHT

- I. EINLEITUNG
- II. METHODIK
 - Prinzip der Untersuchungsmethode
 - Anordnung der Versuche
 - Kapillar-Adhäsionmeter nach MARX-DERLATH
 - Verbesserung der Glaskapillare
 - Zaponierung der Kapillaren
 - Reinigung
 - Zählung der Thrombozyten
 - Silikonisierung
 - Versuchsablauf
- III. ABHÄNGIGKEIT DER ADHÄSION VOM ALTER DER THROMBOZYTEN UND VON DER TEMPERATUR
- IV. SEQUESTREN ALS INHIBITOR
- V. NIAMID
- VI. UNTERSUCHUNGEN ANDERER AUTOREN ZU ADHÄSION UND AGGLOMERATION
 - Einfluss des Thrombins auf die Thrombozyten
 - Trennung von Adhäsion und Agglomeration als zwei verschiedene Vorgänge
- VII. FAKTOR "R"
 - Die chemische Natur des Faktor "R"
 - Herstellung des Hämolyats
- VIII. ZUSAMMENFASSUNG
- IX. LITERATURVERZEICHNIS

EINLEITUNG

Für das Problem der Thrombose und hämorrhagischer Störungen ist die Aufklärung des Mechanismus von Adhäsion und Agglutination der Thrombozyten von grosser Wichtigkeit. Diese beiden Eigenschaften der Thrombozyten als initiale Reaktion der Hämostase und arteriellen Thrombose sind in letzter Zeit durch das Studium adhäsionsfördernder Stoffe weiter erforscht worden und lassen die Funktion der Thrombozyten in neuem Licht erscheinen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Studien zur Methodik der Funktionsprüfung von Thrombozyten *in vitro*.

Die folgenden Beobachtungen an gefässfremden Oberflächen sind für ein so empfindliches und ausserhalb des Körpers sich in ständiger Veränderung befindliches System natürlich den Verhältnissen *in vivo* nicht voll entsprechend. Eine Untersuchungsmethode *in vivo* wäre vielleicht in ihrem Ergebnis vom physiologischen Standpunkt aus betrachtet befriedigender, aber am Menschen nicht durchführbar.

Doch zeigen einige Krankheitsbilder, wie z.B. Zustände nach Transfusion unverträglichen Blutes oder ausgedehnten Verbrännungen mit intravasaler Hämolysen, Thrombosen bzw. Thrombopenien, deren Ursachen durch experimentelle Untersuchungen in den vergangenen Jahren erklärt sein können.

Durch unsere Methodik bedingt konnten solche Ergebnisse, die in der Thrombozytenauszählung starke Agglutinate aufwiesen, nicht ausgewertet werden. Es lag daher in unserem Interesse und gab Anlass zu verschiedenen methodischen Untersuchungen, eine Agglutinatbildung möglichst zu vermeiden.

Im Prozess der stufenweisen Zusammenballung geformter Blutelemente bezeichnen wir die physiologische Verfilzung der Blutplättchen im Verlauf ihrer viskösen Metamorphose, sowie alle anderen Formen der Zusammenlagerung ausser der immunologischen (Agglutination) als Agglomeration. Dabei sind wir uns im klaren darüber, dass Adhäsionsstudien der Thrombozyten nur einen Teil des physiologischen Mechanismus erfassen. Wir glauben aber, dass damit eine wesentliche Funktion widergespiegelt wird.

METHODIK

Prinzip der Untersuchungsmethode

Der Kapillarmethode von MARX-DERLATH liegt der Gedanke zugrunde, dass die sich in einer Blutsäule an einer genormten Kapillarwand entlang bewegenden Thrombozyten an dieser zum Teil haften bleiben.

Auch wir nahmen an, dass bei konstanten Versuchsbedingungen (gleiche Kapillare, genormte innere Oberfläche, gleiche Temperatur und gleiche Zeit der Versuchsdauer) das Verhältnis der Zahl der haftengebliebenen Thrombozyten zu ihrer Zahl im unbelasteten Blut, als ein direktes Mass für ihre Fähigkeit, an blutfremden Oberflächen zu adhären, gelten kann.

Diese relative Verminderung der Thrombozyten, ausgedrückt in Prozent, erwies sich als beste und übersichtlichste Darstellung der Versuchsergebnisse, da die Zahl der Thrombozyten bei den verschiedenen Versuchspersonen naturgemäss stark variierte und wir einen allgemeinen Einblick in das Verhalten der Thrombozyten geben wollen.

Aus zahlreichen Vorversuchen war klar ersichtlich, dass die Viskosität des verwendeten Blutes, also sein Hämatokrit, von entscheidender Bedeutung für die Adhäsion der Thrombozyten ist.

Als Versuchspersonen kamen zunächst aber nur klinisch gesunde Personen in Frage, deren Hämatokritwert sich in den Grenzen der Norm befand. Für uns sichtbarer Ausdruck des nur geringfügig differierenden Hämatokritwertes war die Zahl der Durchläufe des unter konstant gehaltenen Versuchsbedingungen kontrollierten Blutes; In einer Versuchszeit von 5 Minuten durchlief die Blutsäule in der Kapillare die Versuchsstrecke von 37 cm durchschnittlich 20 mal, die Zahl der Durchläufe differierte im Mittel um maximal zwei.

Anordnung der Versuche

Kapillar-Adhäsionsmeter nach MARX-DERLATH

In einem wassergefüllten Glaszylinder von 40 cm Länge, befindet sich, in durchbohrten Gummistopfen gehalten, eine Glaskapillare (innerer Durchmesser der vier aus einem Stück angefertigten Kapillaren; 1,0 mm), deren Enden je etwa 3 cm aus den Stopfen hervorragen. Eine zweite Bohrung in einem der Gummistopfen nimmt ein Thermometer zur Kontrolle der Temperatur im Wasserbad auf. Der Glaszylinder ist in der Mitte an einer um eine zentrale Achse drehbaren Scheibe mit einer Halterung, die ein rasches Auswechseln der Glaszylinder ermöglicht, befestigt. Unter dem Glaszylinder befindet sich eine elektrische Heizung. Eine verstellbare Klammer an der Peripherie der Scheibe ermöglicht die Einstellung des Kippwinkels, um den die Kapillare nach rechts

oder links gedreht wird (in unserer Versuchsanordnung 20°).

Verbesserung der Glaskapillare

Eine den Versuchsbedingungen gerecht werdende Zaponierung (Überziehen der Kapillarinnenfläche mit verdünntem Zaponlack) wurde eigentlich erst dadurch erreicht, dass die beiden Öffnungen der Glaskapillare konisch aufgeschmolzen wurden. Die Lackfolie überzieht somit kontinuierlich die gesamte benetzbare Innenfläche der Kapillare, ohne sich abzulösen, oder dass das eingebrachte Blut mit der Glasoberfläche in Berührung kommt.

Zaponierung der Kapillaren

Umfangreiche Vorversuche liessen immer wieder erkennen, dass eine mit konzentrierter Schwefelsäure gereinigte Glaskapillare trotz ausgiebiger Nachspülung mit aqua dest. durch vermehrte Agglomeratbildung von Thrombozyten im durchlaufenden Blut die Auswertung der Ergebnisse stark erschweren kann. Wir verwendeten darum wieder den schon von MARX und KÖPPEL zu Evolutionsstudien benutzten, und von HUBRICH nach einem Vorschlag von R. MARX in die Kapillar-Adhäsionmetrie eingeführten Zaponlack (Methylzellulose).

Zur besseren Filmbildung wurde er mit amyllum aceticum verdünnt. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Kapillare, die vor jedem Versuch wieder neu zaponiert wurde, dem zu prüfenden Blute eine reproduzierbare Oberfläche darbietet.

Der Zaponlack wurde in die hängenden Kapillaren eingefüllt und überzieht im Abfließen diese mit einem hauchdünnen Film. Nach 10 Minuten Hängen erfolgte ganz leichtes, zunehmend stärker werdendes Durchziehen von Luft mittels der Wasserstrahlpumpe für 5 Minuten. Um ein möglichst vollkommenes Antrocknen zu erreichen, zogen wir noch für zwei Minuten erhitzte Luft über einem elektrischen Glühkörper durch.

Reinigung

Nacheinander wurden mit der Wasserstrahlpumpe Wasser zum Abspülen der Blutreste, Azeton zur Lacklösung, Äther zum Trocknen der so gereinigten Oberfläche durchgespült. Anschliessend wurde 10 Minuten lang Luft durchgezogen. Nach etwa zehnmalem Gebrauch folgte intensive Reinigung der Kapillare mit konzentrierter Schwefelsäure.

Zählung der Thrombozyten

Das mit dem Inhibitor 1 : 5 gut vermischte Venenblut wird in einer Leuko-Pipette bis zur Marke 0,5 aufgezogen und bis zur Marke 11 mit einem Gemisch

Novocain-Sequestren verdünnt. Bis zur Hämolyse des Blutes wird die Pipette ständig geschüttelt, um eine Agglomeration der im so verdünnten Blut leicht zu Boden sinkenden Thrombozyten zu verhindern. Dieses Novocain-Sequestren-Gemisch wurde zur Hämolyse des Blutes darum verwendet, weil durch die mechanischen Beanspruchungen der Thrombozyten während des Versuches diese so verändert werden, dass sie äusserst leicht agglomerieren, und zwar:

1. Schon in der Kapillare während der Durchläufe. Dabei ist anzunehmen, dass die kompakten Agglomerate nicht so kleben bleiben, wie die einzelnen Thrombozyten, da sie im Strom mitgerissen werden.
2. Entstehen die Agglomerate erst nach dem Versuch bei der Sedimentation in der Zählpipette. Diese Agglomeration konnte deutlich nachgewiesen und auch durch das Novocain nicht vollständig verhindert werden. Zur Hämolyse verwendeten wir nach einigen Vorversuchen ein Gemisch von Novocain und Sequestren, um die adhäsionsmindernde Eigenschaft des Sequestren auszunutzen. Als beste Konzentration erwiesen sich 150 mg Sequestren in 100 ml Novocain. Mit steigender Sequestrenkonzentration verlangsamt sich die Hämolyse bei 300 mg % tritt die vollständige Hämolyse erst nach 30 Minuten ein.

Nach erfolgter Hämolyse wurde eine Neubauer-Kammer beschickt und diese bis zur Sedimentation der Thrombozyten (15 - 20 Minuten) in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Die phasenkontrastmikroskopische Auszählung der Thrombozyten erfolgte in 10 mittleren Quadraten. Durch Multiplikation mit 600 erhält man die absolute Thrombozytenzahl in einem cmm.

Silikonisierung

Um die Thrombozyten vor Beginn des eigentlichen Versuches einer möglichst geringen Beanspruchung auszusetzen, wurden Spritzen und Kanülen folgendermassen silikonisiert:

Glasteile: In 6 Teile Silikon-Imprägnierungsmittel WS 70 Wacker mit 94 Teilen Reinbenzin getaucht und anschliessend getrocknet. Wiederholung, wenn die abstossende Wirkung des Silikon bei Prüfung mit aqua dest. nicht mehr auftrat. Kanülen: In einer Mischung von 0,5 Teilen Monocote und 99,5 Teilen aqua dest., 3 Minuten kochen, anschliessend sterilisieren.

Versuchsablauf

In die auf 37°C vorgewärmte Kapillare wird das in der Abnahmespritze aufbewahrte, gut vermischte Blut nach Verwerfen der ersten Tropfen auf eine Blutsäulenlänge von 10 cm direkt eingefüllt.

Die Blutsäule wurde jetzt, um den eigentlich stark verzögert ablaufenden ersten "Benetzungslauf" des Blutes in der um den Versuchswinkel gedrehten Ka-

pillare auf 30 Sekunden konstant zu halten, in dieser Zeit bis zum Ende der Kapillare gesogen (der Versuchsweg hat eine Länge von 37 cm). Die Fließgeschwindigkeit der weiteren Durchläufe bleibt dann konstant. Um im Sinne einer weitgehenden Normung des Versuchsablaufes zu erreichen, dass die Versuchszeit genau 5 Minuten beträgt, gleichzeitig aber die Entnahme des geprüften Blutes stets am gleichen Ende der Kapillare erfolgte, wurde es mitunter notwendig, den Kippwinkel schon dann zu ändern, wenn die Blutsäule erst die Mitte der zu durchlaufenden Strecke erreicht hatte.

Das Blut wurde dann auf ein mit Paraffin überzogenes Uhrglasschälchen gebracht und sofort in die Zählpipette aufgenommen.

ABHÄNGIGKEIT DER ADHÄSION VOM ALTER DER THROMBOZYTEN UND VON DER TEMPERATUR

Bei den folgenden Untersuchungen stellten wir fest, dass das in der Abnahmespritze bei Raumtemperatur aufbewahrte Blut sich derartig veränderte, dass eine stark erhöhte Agglomerationsbereitschaft der Thrombozyten die Messergebnisse negativ beeinflusste und zahlreiche Versuche nicht ausgewertet werden konnten.

Auch zeigten die Beobachtungen des bei 20° C aufbewahrten Blutes deutlich erhöhte Adhäsionswerte im Vergleich zu denen des bei 37° C gehaltenen Blutes. In einer zweiten Versuchsreihe gingen wir also dazu über, die Temperaturschwankungen für das zu untersuchende Blut möglichst gering zu halten. Die Spritze mit dem Inhibitor wurde im Brutschrank bei 37° C vorgewärmt und das Blut der Versuchsperson in der Spritze auch während des Versuchsablaufes dort aufbewahrt. Wie die folgenden Ergebnisse zeigen, treten Agglutinate bei dieser Anordnung wesentlich seltener und in weniger massiver Form auf.

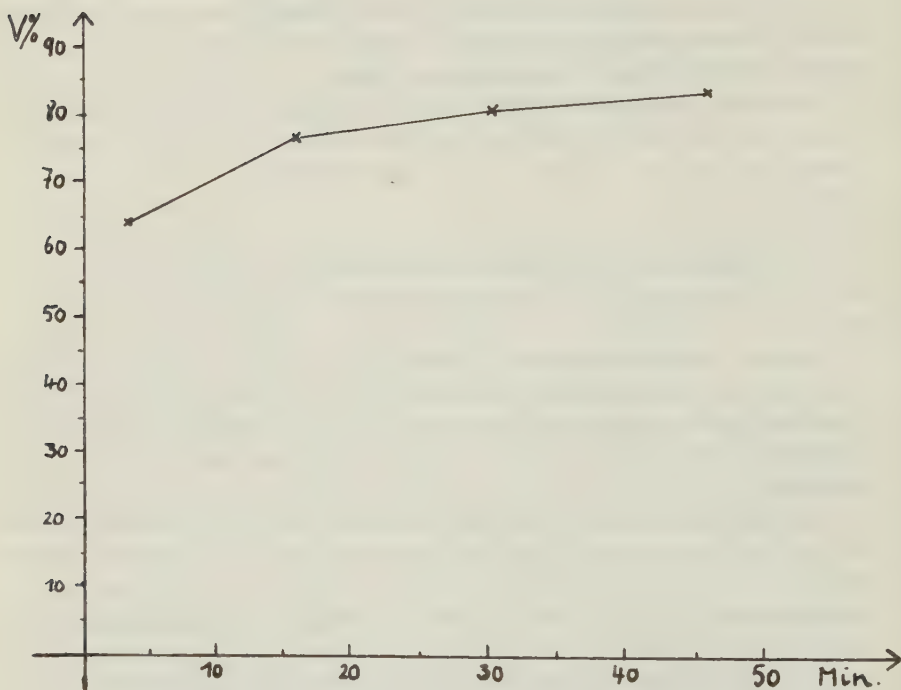
Citratblut bei 20° C (Zimmertemperatur)

V % = Verminderung der Thrombozyten nach den Durchläufen in Prozent

Alter = Alter des Blutes vom Zeitpunkt der Entnahme an gerechnet.

	Alter	V %		Alter	V %
1. V. P.	3'	81 %	4. V. P.	3'	76 %
	30'	80 %		15'	73 %
				45'	78 %
2. V. P.	3'	32 %	5. V. P.	3'	32 %
	15'	74 %		15'	69 %
	90'	79 %		45'	79 %
3. V. P.	3'	71 %	6. V. P.	3'	32 %

Alter	V %	Alter	V %
15'	75 %	15'	74 %
45'	85 %	90'	79 %
		100'	78 %

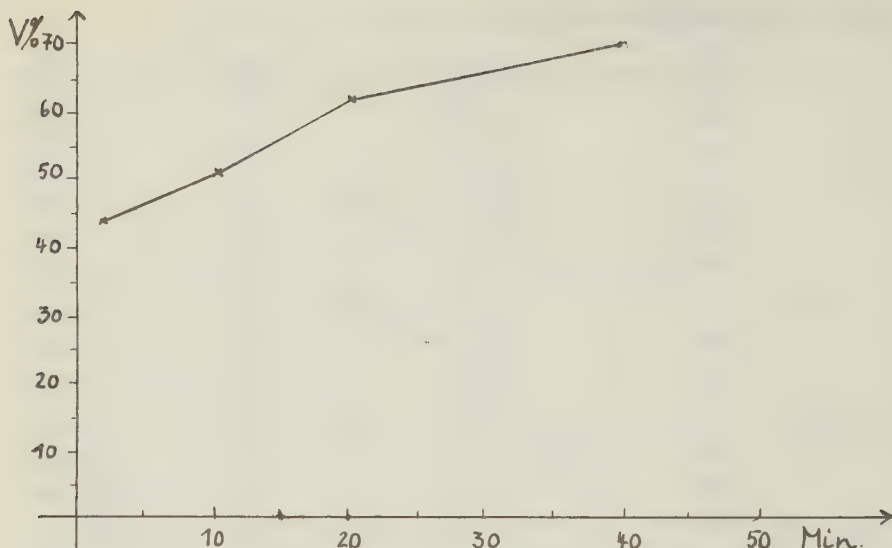


Graphische Darstellung der Thrombozytenadhäsion verschiedener Versuchspersonen in Citratblut, aufbewahrt bei 20°C. Die Mittelwerte der Thrombozytenverminderung in Prozent wurden gebildet:

- Bei 3' aus 6 Versuchsergebnissen = 63 %
- bei 15' aus 5 Versuchsergebnissen = 76 %
- bei 30' aus 3 Versuchsergebnissen = 79 %
- bei 45' aus 2 Versuchsergebnissen = 81 %

Citratblut bei 37° C (Brutschrank)

	Alter	V ‰		Alter	V ‰
1. V.P.	2'	42 ‰	2. V.P.	2'	47 ‰
	10'	50 ‰		20'	58 ‰
	40'	60 ‰		40'	72 ‰
3. V.P.	2'	46 ‰	4. V.P.	2'	63 ‰
	20'	60 ‰		20'	73 ‰
	40'	71 ‰		40'	70 ‰
5. V.P.	2'	47 ‰	6. V.P.	2'	43 ‰
	20'	53 ‰		20'	61 ‰
	40'	62 ‰		40'	71 ‰
7. V.P.	2'	22 ‰	8. V.P.	2'	55 ‰
	20'	44 ‰		20'	68 ‰
	40'	53 ‰		40'	77 ‰
9. V.P.	2'	38 ‰	10. V.P.	2'	40 ‰
	20'	68 ‰		20'	61 ‰
	40'	77 ‰		50'	79 ‰
				90'	87 ‰
			11. V.P.	2'	56 ‰
				20'	69 ‰
				50'	81 ‰
				90'	89 ‰



Graphische Darstellung der Thrombozytenadhäsion verschiedener Versuchspersonen in Citratblut, aufbewahrt bei 37°C. Die Mittelwerte der Thrombozytenverminderung in Prozent wurden gebildet:

Bei 2' aus 11 Ergebnissen = 43 %
 bei 10' aus 2 Ergebnissen = 50 %
 bei 20' aus 10 Ergebnissen = 61 %
 bei 40' aus 9 Ergebnissen = 68 %

Bei dieser Versuchsreihe traten Agglutinate in wesentlich geringerem Masse auf.

Wir beobachteten auch, dass die Thrombozyten weiblicher Versuchspersonen oft eine ausgeprägtere Agglutinationstendenz aufwiesen, als die der männlichen Versuchspersonen. Eine Abhängigkeit dieses Phänomens vom hormonellen Zyklus konnte nicht festgestellt werden. Vielmehr befanden sich diese Versuchspersonen in verschiedenen Phasen ihres Zyklus.

Zur Prüfung gelangte weiterhin das Blut einer Patientin, die an einer schon von anderen Autoren untersuchten Thrombasthenie GLANZMANN - NAEGELI leidet:

Alter	V %
2'	20 %
20'	17 %
40'	20 %

SEQUESTREN ALS INHIBITOR

Sequestren ist ein besonders in alkalischer bzw. neutraler Lösung hochwirksames Ca-bindendes Antikoagulans, und es wurde zuerst von DYCKERHOFF, MARX und LUDWIG (1942) als Gerinnungsinhibitor für Menschenblut beschrieben.

Sequestren verhindert die morphologischen Veränderungen bzw. die Agglutination von Thrombozyten, daher bewährt es sich bei der Konservierung von Thrombozyten im Transfusionsblut und bei morphologischen Thrombozytenstudien (MARX-DERLATH 1957).

HELLEM (2) untersuchte die Thrombozytenadhäsion bei unterschiedlichen Sequestrenkonzentrationen. Die Lösungen unter 2 m Mol liessen keine Untersuchungen zu, weil eine partielle Gerinnung stattfand. Bei 4 m Mol war die Adhäsion nicht messbar, mit steigender Sequestrenkonzentration wird die Adhäsion aufgehoben.

Unsere Versuche hatten das Ziel, die Konzentration von Sequestren zu finden, die zwar die Neigung der Thrombozyten sich zu Agglomeraten zusammenzuballen möglichst aufhebt, ihre Fähigkeit aber, an blutfremden Oberflächen festzuhaften, zumindestens im durch unsere Methode testbaren Bereich enthält.

Sequestren wurde in kristalliner Form abgewogen und in Natrium-Citrat gelöst. Lagerung des Blutes bei 20 °C (Raumtemperatur).

Sequestren 30 mg % in Citrat

Bei jeder Versuchsperson wurde zum Vergleich ein Leerwert in Citrat bestimmt.

	Citrat	Sequestren - Citrat
	Alter	V %
1. V.P.	30'	68 %
	60'	65 %
	90'	60 %

Sequestren 50 mg % in Citrat

1. V.P.	3'	38 %	
	25'		67 %
	30'	67 %	
	40'		75 %
2. V.P.	10'	77 %	
	40'		56 %
	60'	84 %	
	85'		59 %

		Citrat	Sequestren - Citrat	
	Alter	V %		V %
3. V.P.	10'	69 %		
	25'			69 %
	50'	88 %		
	75'			61 %
4. V.P.	10'	56 %		
	35'			67 %
	60'	75 %		
	70'			67 %
5. V.P.	40'	88 %		
	50'			80 %
	70'	55 %		
	90'			69 %
<u>Sequestren 70 mg % Citrat</u>				
1. V.P.	40'	81 %		
	60'			60 %
	75'	78 %		
	90'			50 %
2. V.P.	10'	81 %		
	30'			57 %
	40'	78 %		
	50'			65 %
3. V.P.	10'	-		
	30'	-		
	60'			60 %
	90'			53 %
4. V.P.	15'	70 %		
	45'			52 %
	65'	70 %		
	85'			42 %
5. V.P.	15'	82 %		
	25'			50 %
	60'	85 %		
	75'			48 %
6. V.P.	30'	78 %		
	45'			72 %
	60'	82 %		
	90'			62 %

	Alter	Citrat	V %	Sequestren-Citrat V %
7. V.P.	20'		69 %	
	30'			73 %
	60'		80 %	
	80'			63 %
<u>Sequestren 90 mg % in Citrat</u>				
1. V.P.	10'		58 %	
	55'			50 %
	80'		Aggl.	
	130'			48 %
2. V.P.	10'		63 %	
	45'			45 %
	90'		Aggl.	
	105'			42 %
	120'			50 %
<u>Sequestren 100 mg % in Citrat</u>				
1. V.P.	5'		63 %	
	15'			42 %
	25'		73 %	
	40'			26 %
2. V.P.	10'		64 %	
	30'			29 %
	45'		55 %	
	60'			32 %
3. V.P.	20'		42 %	
	30'			22 %
4. V.P.	15'		60 %	
	25'			24 %
	40'		Aggl.	
	50'			20 %
	100'			23 %
5. V.P.	15'		65 %	
	25'			25 %
6. V.P.	5'			26 %
	15'		71 %	
	20'			22 %
	30'			23 %

Citrat		Sequestren - Citrat
Alter	V ‰	V ‰
40'		26 ‰
210'		29 ‰
240'		24 ‰
Verlängerung der Durchlaufzeit auf 10 Minuten:		
250'		40 ‰
7. V. P.	74 ‰	
15'		41 ‰
40'		30 ‰
50'		55 ‰
120'		
Verlängerung der Durchlaufzeit auf 10 Minuten:		
130'		74 ‰

NIAMID

Japanische Autoren (7) untersuchten Niamid (Nialamid) auf seinen anti-thrombotischen Effekt und veröffentlichten Versuchsergebnisse, in denen sie experimentell die Wirkung des Niamid auf die Funktion der Thrombozyten und die Klebrigkeit intravascularer Endothelien nachwiesen. Sie konnten zeigen, dass die erhöhte Adhäsivität der Thrombozyten, hervorgerufen durch Adrenalin, hochmolekulare Substanzen und fettreiche Mahlzeiten, durch Niamid herabgesetzt werden konnte. Gemessen wurde die Adhäsion der Thrombozyten nach MOOLTEN, die Auszählung erfolgte nach der Methode von OLEF.

Die adhärenenten Thrombozyten wurden in ein Verhältnis zu den nicht klebengebliebenen Thrombozyten gesetzt und daran ihre Funktionstüchtigkeit gemessen. Die Versuchspersonen wurden mit einer Dosis Adrenalin vorbehandelt oder einem anderen Stress (physische und psychische Beanspruchung), der die Thrombozytenklebrigkeit heraufsetzt, unterzogen.

Die Thrombozyten dieser Versuchspersonen wurden während dieser Belastung und dann nach der Gabe von Niamid (Einzeldosis von 100 mg) auf ihre Adhäsivität hin untersucht. Eine deutliche Herabsetzung der Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit von der Dosierung des Niamid wurde bis zu 90 Minuten gefunden. Diese ED von 100 mg war in den meisten Fällen wirksam, während die ED von 50 mg nur in weniger als der Hälfte der Fälle den erwünschten Erfolg brachte. Die Autoren konnten anhand ihrer Versuchsergebnisse feststellen, dass die Therapie mit Niamid (bei thrombotischen Gefässerkrankungen, Herzgefäßveränderungen, Myocardinfarkt, Thrombose, Angina pectoris) eine "Einschuss-therapie"

von optimal 100 mg sein muss.

Versuche mit Niamid

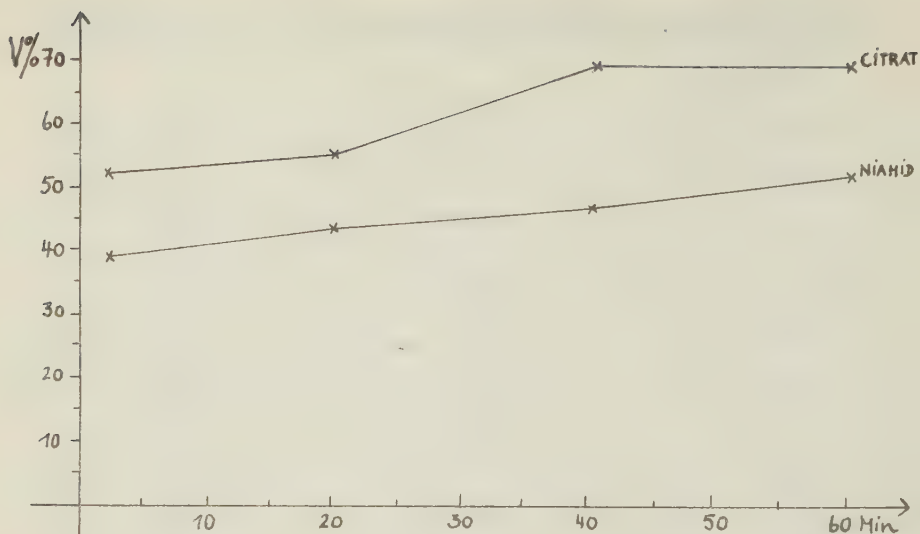
Das sterile, kristalline Niamid ist in der als Inhibitor verwendeten Na-Citratlösung nicht löslich. Die Kristalle wurden in der dem Injektionspräparat beigegebenen Flüssigkeit gelöst. (500 mg in 5 ml). Diese Lösung wurde dann 1 : 100 mit Na-Citrat (3,8 %ig) verdünnt. So erhielten wir eine Stammlösung, von der 1 ml 1 mg des kristallinen Niamid enthält (= 100 mg %). Bei dem dann üblichen Verhältnis von Inhibitor : Blut = 1 : 5 liegt das dem Blut vermischte Niamid in einer Endkonzentration von 20 mg % vor.

Von jeder der folgenden Versuchspersonen wurde die Thrombozytenadhäsion in Citratblut als Leerwert verglichen mit der Adhäsivität der Thrombozyten in dem mit Niamid versetzten Blut. Das Blut wird bei 37°C aufbewahrt.

	Alter	Citrat	V %	Niamid V %
1. V.P.	2'		47 %	
	20'			44 %
	40'		74 %	
	60'			47 %
3. V.P.	2'		32 %	
	20'			45 %
	40'		70 %	
	60'			65 %
4. V.P.	2'		40 %	
	20'			49 %
	40'		67 %	
	60'			65 %
5. V.P.	2'			28 %
	20'			30 %
	40'		45 %	
	60'			35 %
6. V.P.	2'		47 %	
	20'			34 %
	40'		60 %	
	60'			45 %
7. V.P.	2'		61 %	
	20'			40 %
	40'		72 %	
	60'			42 %

	Alter	Citrat	V %	Niamid V %
8. V. P.	2'		62 %	
	20'			40 %
	40'		75 %	
	60'			38 %
9. V. P.	2'			40 %
	20'		51 %	
	40'			53 %
	60'		65 %	
10. V. P.	2'			60 %
	20'		51 %	
	40'			61 %
	60'		65 %	
11. V. P.	2'			33 %
	20'		42 %	
	40'			32 %
	60'		65 %	
12. V. P.	2'			53 %
	20'		66 %	
	40'			60 %
	60'		79 %	
13. V. P.	2'			35 %
	20'		52 %	
	40'			40 %
	60'		55 %	
14. V. P.	2'			30 %
	20'		58 %	
	40'			34 %
	60'		68 %	
15. V. P.	2'			29 %
	20'		59 %	
	40'			42 %
	60'		65 %	
16. V. P.	2'			24 %
	20'		35 %	
	40'			33 %
	60'		48 %	

	Alter	Citrat	V %	Niamid V %
17. V.P.	2'			48 %
	20'		70 %	
	40'			55 %
	60'		73 %	



Graphische Darstellung der Thrombozytenadhäsion verschiedener Versuchspersonen. Ein Vergleich von Citratblut und Niamid in Citrat (20 mg %) als Inhibitor. Die Mittelwerte der V % wurden gebildet

für Citrat;

Bei 2' aus 6 Ergebnissen = 51 %
 bei 20' aus 9 Ergebnissen = 54 %
 bei 40' aus 8 Ergebnissen = 67 %
 bei 60' aus 9 Ergebnissen = 65 %

für Niamid:

bei 2' aus 11 Ergebnissen = 38 %
 bei 20' aus 8 Ergebnissen = 42 %
 bei 40' aus 9 Ergebnissen = 45 %
 bei 60' aus 8 Ergebnissen = 50 %

Trennung von Adhäsion und Agglomeration als verschiedene Vorgänge

Da bei unserer Methode zur Untersuchung der Thrombozytenadhäsion Agglomeration und Adhäsion als zwei getrennte Vorgänge imponieren, die zur isolierten Erfassung der Thrombozytenadhäsion möglichst zu verschiedenen Zeiten stattfinden sollten, erscheint uns das Studium dieser Eigenschaften der Thrombozyten besonders wichtig. Als Ursachen der Thrombozyten-Agglutination bzw. Agglomeration kommen folgende Faktoren in Frage;

1. Agglutination durch Kälteagglutinine
2. Agglomeration durch Alterung
3. Agglomeration durch Thrombineinfluss

4. Agglomeration durch Zellalterationen.

LUNDEVALL (1958) fand eine unspezifische Thrombozytenverklumpung, die bei 20°C auftrat, bei 37°C aber fast verschwand.

HELLEM (2) gibt an, dass eine Temperaturschwankung zwischen 0°C und 37°C die Adhäsion von Thrombozyten in Citratblut an blutfremden Oberflächen nicht beeinflusst.

Bei Untersuchung des Faktor "R" durch HELLEM (2) stand das gleiche Problem zur Diskussion. Eine Standardlösung von Faktor "R" wurde 1 ml thrombozytenreichem Plasma zugesetzt. In 15 bis 20 Sekunden trat eine Agglomeration der Thrombozyten ein, die sich zu grösseren Agglomeraten zusammenlagerten, sedimentierten bzw. an der Wand adhärten. Wurde die Konzentration von Faktor "R" unter einer gewissen Grenze gehalten, verschwanden die Agglomerate nach 10 bis 20 Minuten.

Diesen Experimenten entnimmt HELLEM und bestätigt damit auch frühere Ansichten anderer Autoren (BRAUNSTEINER 1955), dass Agglutination und Adhäsion getrennte Vorgänge sind, aber in enger Beziehung zueinander stehen. Er betont jedoch, dass nur "lebende" Thrombozyten, d. h. solche, die nicht längere Zeit bei Raumtemperatur in Citrat-Plasma stehen, diese Reaktionen zeigen. Diese Beobachtungen konnten auch durch eigene Untersuchungen bestätigt werden, die uns zeigten, dass Thrombozyten in Citratblut, das über mehrere Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, nur durch ausserordentlich hohe Konzentrationen des Faktor "R" zur Agglomeration neigten.

Der Einfluss des Thrombins auf die Thrombozyten

Die Ursache für die Thrombozytenagglomeration bei der viskösen Metamorphose in der Wirkung des Thrombins in Verbindung mit 2-wertigen Kationen zu suchen, ist eine bekannte Tatsache. Da Thrombin als spezifisches Substrat Fibrinogen hat, deutete LÜSCHER (4) die Thrombozytenagglutination, die eine typische Manifestation der viskösen Metamorphose der Thrombozyten ist, als Konsequenz der Fibrinogen-Fibrin Umbildung.

JACKSON UND CONLEY veranschaulichten diese Ansicht durch folgenden Versuch: Eine leichte Trypsinbehandlung von Thrombozyten machte diese reversibel inagglutinabel für Thrombin. Auf Zusatz einer Lösung von Thrombin, Fibrinogen und 2-wertigen Kationen traten wieder Agglutinate auf.

LÜSCHER (4) erklärte den Einfluss des Thrombins auf die Thrombozyten einmal durch Veränderung ihrer inneren Struktur, zum anderen hält er Reaktionen mit Stoffwechselprodukten der Thrombozyten für möglich. Untersuchungen bei Temperaturen, die Fibrinogen unbeeinflusst liessen, bei denen die Thrombozyten aber ihre Agglutinationsfähigkeit bzw. ihre Retraktionsaktivität verloren, schienen LÜSCHER zu der Annahme zu berechtigen, die Thrombozy-

tenagglutination mehr als Folge der inneren Veränderung der Thrombozytenstruktur bei ihrer viskösen Metamorphose zu sehen, als die Zusammenballung als eine Nebenerscheinung der Thrombinwirkung auf das Fibrinogen zu werten. Dass die Einleitung der Gerinnung aber nicht durch die Agglutination der Thrombozyten und ihren primären Zerfall stattfindet, belegt K. LENGGENHAGER (5) u. a. durch folgende Beobachtungen:

1. Thrombozyten in einem ganz frischen, durch Defibrinierung gewonnenen Serum blieben stundenlang völlig normal, trotzdem sie nach früheren Ansichten in diesem Ca^{++} -haltigen Milieu sehr schnell zerfallen sollten. Auch auf Zusatz von ideal gepuffertem Thrombin gingen sie nicht in visköse Metamorphose über.
2. Auch die langsame Gerinnung eines plättchenfreien Citrat-Plasmas sei kein Argument für eine plättchenbedingte Gerinnungsauslösung. Ebenfalls Suspensionen von Kaolin oder Kohlepulver verursachten rasche Gerinnung. Den eigentlichen Gerinnungsauslöser sieht der Autor in einem plasmatischen Stoff (Prothrombokinin).

FAKTOR "R"

Die Eigenschaften der Thrombozyten: Evolution, Adhäsion und Agglutination sind lange bekannt. Die Prüfung thrombozytenreichen Plasmas während der Thrombozytenevolution liess die Tatsache zur Beobachtung kommen, dass die Thrombozyten noch vor Einsetzen der Fibrinbildung aneinanderkleben. Im hämostatischen Mechanismus ist dieses Phänomen von ausserordentlicher Wichtigkeit.

Mit ØLLGARD (2), der 1951 berichtete, dass Kochextrakte von Erythrozyten die Zusammenlagerung von Thrombozyten fördern, begannen eine Reihe interessanter Versuche, die heute zur Aufklärung der chemischen Natur dieses agglomerationsfördernden Faktors geführt haben (GAARDER, LAALAND).

Die Studien von HELLEM (2), der diese Beobachtungen von ØLLGARD experimentell belegte, sollen im folgenden kurz wiedergegeben werden, da sie die Eigenschaften des später als ADP aufgeklärten Faktors "R" anschaulich widerspiegeln.

Das Prinzip seiner Methode:

Die Thrombozytenadhäsion wird in Citratblut bei konstanter Konzentration des Citrat im Plasma gemessen. Eine elektrische Maschine pumpt das zu untersuchende Blut durch eine standardisierte Säule von Glaskügelchen (Durchmesser: 0,5 mm) in einem Glaszylinder bei konstantem Umlauf. Die Abnahme der Thrombozyten wurde gewertet als ein Mass der Thrombozyten-Adhäsivität.

HELLEM nimmt an, dass die Verminderung der Thrombozytenzahl durch Adhäsion der Thrombozyten an der Oberfläche der Glaskügelchen zustandekommt. Weitere Gründe der Thrombozytenverminderung sieht er in der Möglichkeit der Auflösung von Thrombozyten, durch Adhäsion an Fibrinfäden oder durch Bildung von Agglomeraten, die die Säule nicht passieren können.

Diese zuletzt genannten Gründe für die Thrombozytenverminderung sieht er jedoch als unwahrscheinlich an mit der Begründung, dass ein Durchlauf 30 Sekunden braucht, die Auflösung der Thrombozyten aber einige Minuten benötigt (DE ROBERTIS et al. 1953). Zum anderen habe er durch mikroskopische Untersuchung der Glaskügelchen weder Fibrinfäden noch Agglomerate gefunden.

Als wesentlich erscheint uns noch die Reinigungsmethode;

Vorbehandeln der Glaskügelchen mit einer Lösung von Soda für 2 Tage, nach Spülen in fließendem Wasser (1/2 Stunde) Einlegen in Chromschwefelsäure für 2 Tage, dann Spülung in fließendem aqua dest., danach Trocknen bei 120 °C für 24 Stunden. HELLEM betont, dass das an den Kugeln haftende Chromat durch reichliches Spülen entfernt werden muss.

In den folgenden Experimenten sieht er seine Beobachtungen bestätigt, dass die Zahl von Erythrozyten im Plasma die Thrombozytenadhäsion in linearer Abhängigkeit beeinflusst, Beobachtungen, die gleichzeitig und unabhängig davon von MARX und HUBRICH (3) gemacht wurden. Im Hinblick auf die Funktion der Erythrozyten und ihre Veränderung durch Kontakt mit blutfremden Oberflächen nimmt er die Alteration von Thrombozyten als Ursache für die erhöhte Adhäsivität als sekundär an.

1. HELLEM setzte Erythrozyten, die durch Kontakt mit blutfremden Oberflächen alteriert waren, einem thrombozytenreichen Plasma zu und fand im Vergleich zu einem Kontrollversuch mit unbeanspruchten Erythrozyten, dass die Adhäsion der Thrombozyten wesentlich höher lag.
2. Um die Lokalisation von Faktor "R" in den Erythrozyten zu untersuchen, setzte er gewaschene bzw. ungewaschene Erythrozyten in gleichen Konzentrationen dem thrombozytenreichen Plasma zu und fand keine unterschiedliche Adhäsion. Auch eine Inkubation von Erythrozyten in Trypsinlösung bei 37 °C konnte ihren adhäsionsfördernden Einfluss nicht vermindern.
3. Hämolyatlösungen, die noch das Stroma der Erythrozyten enthielten, zeigten den gleichen Effekt wie solche Lösungen, die durch Ultrazentrifugieren von "ghosts" befreit wurden.
4. Die Temperaturstabilität des agglutinationsfördernden Faktors fand er bei 100 °C für 30 Minuten, bei -25 °C für 8 Monate.
5. Er beobachtete weiter eine Inaktivierung von Faktor "R" im Plasma. Bei Raumtemperatur sank die Adhäsivität der Thrombozyten in einem mit verschiedenen Konzentrationen von "R" versetzten Plasma. Der Abfall der Thrombozytenadhäsion erschien als abhängig von der Dauer der Inkubation

und der Höhe der Konzentration des zugesetzten Faktor "R".

Die chemische Natur des Thrombozytenagglomerations-Faktors

Frühere Untersuchungen von LUNDEVALL (1958), die agglutinationsfördernde Eigenschaften von Hämoglobin erklären sollten, müssen insofern angezweifelt werden, als nach seiner Methode eine Trennung von Hämoglobin und Faktor "R" nicht durchführbar war.

Jetzt gelang es GAARDER (1) die chemische Natur dieses Faktor "R" als ADP aufzuklären. Nach Angaben von HELLEM (2) wurde ein Extrakt aus Erythrozyten durch Kochen hergestellt und dessen qualitativer Gehalt an agglutinationsfördernder Substanz mittels einer von HELLEM angegebenen halbquantitativen Methode bestimmt:

0,05 ml des Extraktes wurden 0,5 ml des thrombozytenreichen Plasmas zugesetzt. Die Reaktion war positiv, wenn eine Agglomeration von Thrombozyten zu beobachten war. In dem so getesteten Faktor "R"-haltigen Extrakt fand GAARDER mittels UV-Licht typische Extinktionsdiagramme für Nukleotide mit einem Extinktionsmaximum bei 260 m μ ; 6 Fractionen (I-VI) wurden konzentriert und getestet. Nur die Fractionen V und VI waren im Thrombozytenagglutinations-Prozess positiv. Beide Fractionen lieferten durch Hydrolyse Adenin. Die weiteren Untersuchungen GAARDER'S hatten das Ziel, diesen agglutinationsfördernden Stoff zu isolieren und zu testen.

In der Elektrophorese gab die Fraction V zwei UV-absorbierende Zonen. Eine von diesen hatte dieselbe Beweglichkeit im UV-Absorptionsspektrum wie ADP. Durch Chromatographie der Fraction VI wurden 3 Teile, die AMP, ADP und ATP entsprachen, gefunden.

Die Anwesenheit von ADP in Fraction V und VI wurde durch einen spezifischen Enzymtest exakt bewiesen, der auf Prinzipien, die durch LIPMAN (1941) und BÜCHER (1953) angegeben wurden, basiert. 86 % bzw. 50 % ADP wurden in diesen Fractionen gefunden und damit bewiesen, dass es die verantwortliche Substanz für die beobachtete Agglomeration der Thrombozyten ist. Diese Aktivität hat ADP in der Testlösung noch in einer Konzentration von etwa 0,02 μ g/ml. Eine ähnliche Aktivität wurde auch in einem handelsüblichen ADP-Präparat gefunden.

GAARDER testete auch eine Anzahl anderer handelsüblicher Nukleotide auf ihre Aktivität und fand sie alle schwächer als ADP.

Durch Papierelektrophorese gelang es ihm, Versuche mit gereinigtem ATP anzustellen und nachzuweisen, dass ATP die Aktivität von ADP nicht hemmt.

Nach der Untersuchung von 22 Nukleotiden, von denen nur ADP und Desoxy-ADP aktiv waren, nimmt GAARDER an, dass die Thrombozytenklebrigkeit

ein nur durch sehr spezifische Einflüsse zu fördernder Vorgang sei. Durch Untersuchungen mit radioaktiv etikettiertem ADP kam er zu dem Ergebnis, dass das ADP im thrombozytenreichen Plasma nach voll entfalteter Wirkung auf die Thrombozyten im Vergleich zu einem mit gleicher Menge Nukleotid versetzten thrombozytenarmen Plasma, keinen Konzentrationsverlust erleidet.

Nach diesen grundlegenden Untersuchungen von GAARDER über die chemische Struktur des Faktor "R", studierten auch andere Autoren die Wirkung von ADP auf die Thrombozyten.

ØLGARD berichtete 1961 bereits von einer agglutinationsfördernden Substanz nicht nur in Erythrozyten, sondern auch in Thrombozyten, und LÜSCHER u. a. wiesen die ADP-Produktion der Thrombozyten bei Thrombininkubation im Verlauf ihrer viskösen Metamorphose nach. Diese ADP-Bildung beginnt mit einer Freisetzung von ATP aus den Thrombozyten. BETTEX-GALLAND und LÜSCHER (4) berichteten 1951 über die Isolierung eines kontraktilen Proteins aus Thrombozyten, das auch eine ATP-ase Aktivität aufwies. Man kann deshalb erwarten, dass das die Agglomeration auslösende ADP im Verlauf der durch Thrombin induzierten viskösen Metamorphose der Thrombozyten selbst gebildet wird.

Quantitative Messungen von freigelassenem ADP aus Thrombozyten zeigten deutlich, dass Konzentrationen von ADP erreicht werden, die die Agglomeration von Thrombozyten sicherstellen. LÜSCHER kam daher zu dem Schluss, dass die Thrombozyten-Agglomeration ein von anderen Zellen unabhängiger und sich selbst erhaltender Prozess sein kann. Das schliesse aber nicht die Teilnahme von Erythrozyten, besonders unter experimentellen Bedingungen aus, die HELLEM (2) in seinen Untersuchungen ausführlich darstellte.

Um einen Überblick über die Wirkungsweise des ADP auf die Thrombozyten zu bekommen, bemühte sich LÜSCHER ähnlich wie schon vorher GAARDER um die Isolierung von ADP. Er erhitzte einen Überstand von Thrombozyten, die durch ihre visköse Metamorphose verändert waren, um die Thrombinaktivität bzw. um Nukleotidasen zu zerstören. Durch Gel-Filtration und Zentrifugieren wurden denaturierte Proteine und Nukleotide getrennt. Eine Substanz, die bei Extinktionsmessungen im UV-Licht ein Maximum bei 260 m μ hatte, zeigte auch ein Maximum von Agglomerationsaktivität. Dieses UV-Spektrum war identisch mit dem von ADP. Weder gleichzeitig isolierbare Mono- bzw. Triphosphate des Adenosins zeigten einen dem ADP vergleichbaren Effekt, das schon in einer Konzentration von 1 μ g/ml die Thrombozyten zur Agglomeration brachte. Untersuchungsergebnisse von HELLEM für Faktor "R", nämlich die Beeinflussbarkeit nur frischer "lebender" Thrombozyten, konnten auch durch Untersuchungen von so gereinigt dargestelltem ADP bestätigt werden. Aufbewahrung von Thrombozyten im Plasma bei 4 °C hebt die Wirkung von ADP innerhalb von 48 Stunden auf.

Auch Thrombozyten, die gewaschen in eine 0,15 M NaCl-Lösung gebracht

wurden, zeigten keine Reaktion auf ADP, trotzdem sie frisch isoliert waren. Erst wenn sie wieder in frisches Citrat-Plasma gebracht wurden, konnte eine Agglomeration durch ADP beobachtet werden. Diese Ergebnisse führten LÜSCHER zur Annahme eines plasmatischen Nebenfaktors, der für die Wirkungsweise der Nukleotide verantwortlich sei.

ADP, als eine natürliche, intrazellulär in hoher Konzentration vorkommende Substanz, besitzt also einen deutlich nachweisbaren Effekt auf die Thrombozytenagglomeration. Man geht deshalb wohl nicht fehl, wenn man annimmt, dass autolytische Prozesse, die Hämolyse mit Novocain während unseres Versuchsauflaufes bzw. die Beschädigung und Degeneration von Zellen zum Abbau von ATP durch ATP-ase führen und dieser Vorgang damit eine wichtige physiologische Rolle als ein Auslösemechanismus für die anfänglichen Stadien von Hämostase und Thrombose spielt.

Herstellung des Hämolysats

Nach Angaben von HELLEM (2): ein Vol. gepackte, durch Zentrifugieren bei 3000 U/Min. gewonnene Erythrozyten werden in je 1 Vol. physiologischer NaCl 3 mal gewaschen, zentrifugiert, der Überstand verworfen. Die so gewaschenen Erythrozyten in 2 Vol. NaCl in einen Erlenmeyer-Kolben bringen, 15 Minuten in einem Wasserbad bis zum Sieden erhitzen. Auffüllen der verdunsteten Wassermenge mit aqua dest., danach bei 9000 U/Min. 15 Minuten lang zentrifugieren, den Überstand nochmals für 15 Minuten bei 100⁰ C im Wasserbad belassen und die verdunstete Wassermenge wieder durch aqua dest. ersetzen.

Erneut zentrifugieren, den gewonnenen klaren Überstand in der Ultrazentrifuge bei 18000 U/Min. 15 Minuten lang zentrifugieren. Die sonst noch im Mikroskop sichtbaren zahlreichen "ghosts" sind dann im Sediment. Aufbewahren des so gewonnenen Hämolysats bei -25⁰ C.

Wir konnten feststellen, dass dieses Hämolysat schon in äusserst geringer Konzentration - es wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen (1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 in Na-Citrat) in einem Verhältnis von 20 % dem Plasma zugesetzt - eine sehr stark agglomerierende Wirkung auf die Thrombozyten hatte.

Gelang es, bei einem Blut eine so geringe Menge Faktor "R" zuzusetzen, dass bei probeweisem Zusatz zu thrombozytenreichem Citrat-Plasma unter dem Mikroskop keine Agglomerate festgestellt werden konnten, zeigte das Blut, mit der gleichen Menge Faktor "R" versetzt, nach den Durchläufen durch die Kapillaren sehr starke Agglomerate. So war natürlich eine Auswertung der Ergebnisse im Sinne einer erhöhten Adhäsion der Thrombozyten nicht möglich.

ZUSAMMENFASSUNG

Die von R. MARX und S. DERLATH zur Adhäsionometrie von Thrombozyten angegebene Kapillarmethode wurde technisch verbessert. Eine festhaftende Zaponlackfolie bietet den Thrombozyten eine genormte Oberfläche dar.

Vergleichende Messungen der Adhäsion in Citratblut, das bei Raumtemperatur bzw. bei 37 °C aufbewahrt wurde, liessen erkennen, dass die Agglomerationstendenz und die Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten bei 20 °C relativ höher lag, was vielleicht auf einem geringeren Citrateffekt bei dieser Temperatur beruht.

Eine Abhängigkeit der Adhäsion vom Alter des Citratblutes ist deutlich erkennbar. Ein Anstieg der Adhäsivität in den ersten 2 Stunden nach der Blutentnahme (bis zum Auftreten von Agglomeraten, die das Zählergebnis mit einer zu grossen Fehlerquelle belasten) macht es erforderlich, bei vergleichenden Adhäsionsbestimmungen das Blut zur gleichen Zeit der Blutentnahme, d. h. etwa nach 2 Minuten, zu kontrollieren bzw. eine Reihe von Messungen zu genormten Zeitpunkten anzustellen.

Durch steigende Sequestrenkonzentrationen in Citrat wird die Adhäsion herabgesetzt. Bei 100 mg % erreichte die Adhäsion einen gleichbleibend niedrigen Wert, der auch nach 4 Stunden noch nicht erhöht war. Dass aber bei dieser "Sequestrenbelastung" eine Fähigkeit der Thrombozyten zur Adhäsion noch vorliegt, zeigte sich an Versuchen mit doppelter Versuchszeit, bei denen eine erhöhte Adhäsion nachzuweisen war.

Niamid zeigte in bestimmten Dosen einen adhäsionsmindernden Effekt auf Thrombozyten in Citratblut in vitro silicanisato. Die Adhäsivität der Thrombozyten ist auch unter der Wirkung dieses Medikamentes vom Alter des extravasierten Blutes abhängig.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) GAARDER, A.M.,
LAALAND, S. "The chemical nature of the platelets adhesiveness factor", Proc. 8th Congr. Europ. Soc. Haematology, Vienna 1961, No. 361, Karøer, Basel 1961.
- (2) HELLEM, A.J. "The adhesiveness of human blood platelets in vitro", Oslo University Press, Norwegian Monographs on Medical Science.
- (3) HUBRICH, I. "Modellversuche zur Pathogenese der Thrombose vom Gesichtspunkt der Thrombozytenadhäsion", Dissertation 1958, aus der I. Med. Klinik der Universität München.
- (4) KÄSER-GLANZMANN
LÜSCHER, E.F. "The mechanism of platelets aggregation in relation to hemostasis", Thrombosis et diathesis hämorrhagica 15. VII. 1962
Friedrich Karl Schauttauer Verlag
- (5) LENGGENHAGER, K. "Argumente gegen die Einleitung der Blutgerinnung durch Blutplättchen", Proc. 8th. Congr. Europ. Soc. Haematology, Vienna 1961, No. 361
Karge., Basel 1962
- (6) MASON, R.G. jr. "Pathogenesis of thrombosis; platelet contribution", Meeting reports 16. Nov. 1962
- (7) SHIMAMOTO, T. "Mao Inhibitor Niamide, a new type of antithrombotic substance in vascular, especially cardiovascular disorder", reprinted from the Asian medical journal vol. 4 No. 12, P. 5 - 28, 1961.

LEBENS LAUF

Am 10. März 1938 wurde ich als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Günther Roeber und seiner Ehefrau Irmela, geb. Gerhard in Torgau/Elbe geboren.

Die Volksschule in Torgau besuchte ich von 1944-1952. die Reifeprüfung legte ich nach vierjährigem Oberschulbesuch, von 1952-1956, in Torgau ab.

Mein Medizinstudium begann ich 1956 an der Humboldt-Universität in Berlin. Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung studierte ich zwei Semester an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

An der Ludwig-Maximilians-Universität in München beendete ich mein Studium mit der ärztlichen Prüfung im Juni 1962.

